



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59232 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДВОСТУПІНЧАТОЇ ГЛУТАРАЛЬДЕГІДНОЇ КОН'ЮГАЦІЇ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

1

2

(21) u2010111983

(22) 11.10.2010

(24) 10.05.2011

(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.

(72) СУХАРЄВ ЮРІЙ СТАНІСЛАВОВИЧ

(73) СУХАРЄВ ЮРІЙ СТАНІСЛАВОВИЧ

(57) Спосіб двоступінчатої глутаральдегідної кон'югації ентеротоксинів *E.coli*, що включає: культивування

токсигенних штамів на Синтетичному поживному середовищі, одержання безклітинних супернатантів, який відрізняється тим, що використовують нативні ентеротоксини, обробляють термолабільний ентеротоксин глутаровим альдегідом, видаляють залишок альдегіду діалізом і приєднують гаптен до модифікованого носія.

Корисна модель належить до біотехнології, медичної та ветеринарної мікробіології, а саме до способу двоступінчатої глутаральдегідної кон'югації термостабільного і термолабільного - ентеротоксинів *E.coli*.

Основними патогенетичними факторами *E.coli*, які викликають діарею у людей і тварин є ентеротоксини: термолабільний (LT) і термостабільний (ST). Але з двох видів ентеротоксинів тільки LT має імуногенні властивості, тоді як ST- гаптен, що не дозволяє одержати імунізуючі і діагностичні препарати на його основі. Можливим способом подолати неімуногенність ST-ентеротоксину, є кон'югація його з білковими носіями, які мають більшу молекулярну масу [Klipstein F.A., Development of a vaccine of eros-slinked heat-stable and heat-labile enterotoxins that protects against *E.coli* producing either enterotoxin /F.A. Klipstein, R.F. Engert, J.D. Clements //Infect. Immun.-1981.-34.-P.1086-1092; Van Wynendaele F., Induction of immunity against *E.coli* ST-enterotoxin /F.Van Wynendaele, L. Dobrescu, B. Boon // Zbl. Veter.-Med. Reihe-B.-1982.-bd.29.-s.441-450].

Недоліком способів є їх тривалість, трудомісткість, дорожнеча, важковідтворюваність використання дефіцитних реагентів, низька специфічність.

Існує спосіб одержання кон'югованих ST і LT-ентеротоксинів *E.coli* [Пат. 30128 Україна, A61K 39/108. Спосіб виготовлення гіперімунної анитоксичної сироватки крові до кон'югата термостабільного і термолабільного ентеротоксинів *E.coli*. Сухарев Ю. С., заявл. 06. 11. 2007; опубл. 11. 02. 2008. Бюл. №3.-С. 3.].

За цим способом токсигенні штами *E.coli* окремо культивують на середовищі Хоттінгера, центрифугують, відокремлюють супернатанти з ентеротоксинами, які осаджують сульфатом амонію при різному ступені насичення, видержують преципітати 18-20 годин при 2-4 °С, діалізують осад у дистильованій воді і трис-HCl буфері, проводять гель-фільтрацію на сефадексі G-25, визначають кількість білка, після чого об'єднують LT і ST у співвідношенні 100:1 М і кон'югують за допомогою глутаральдегіду, діалізують проти фосфатного і трис-HCl-буфера, додають бичачий сироватковий альбумін. Цей спосіб може бути прототипом.

Недоліком існуючого способу є тривалість (70 годин), трудомісткість процесів очистки ентеротоксинів, низький вихід кінцевого кон'югата (-40 %), за рахунок утворення ковалентних зв'язків між молекулами ST-ST під дією глутаральдегіду, а також невисока специфічність кон'югата.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб двоступінчатої глутаральдегідної кон'югації нативних ST і LT-ентеротоксинів *E.coli*, який включає культивування токсигенних штамів на Синтетичному поживному середовищі [Синтетичне поживне середовище для культивування *E.coli*, що продукують термостабільний ентеротоксин / Сухарев Ю. С. Сучасні пробл. вет. медицини: Укр. конф. молодих вчених, листопад 1994 р.-К.-1994.-С.18.], одержання безклітинних супернатантів, обробку LT-ентеротоксина глутаровим альдегідом, видалення залишку альдегіда діалізом і приєднанням гаптена до модифікованого носія.

Використання способу дає змогу прискорити одержання кон'югату у 2,7 разу, збільшити вміст

(19) UA (11) 59232 (13) U

ST в кінцевому продукті у 2,5 разу, за рахунок уникнення утворення ковалентних зв'язків між молекулами ST-ST під дією глутаральдегіду, суттєво скоротити робочий час, зайнятий відповідними операціями; мінімізувати число процедур, підвищити специфічність за рахунок нативних ентеротоксинів, зменшити трудомісткість і використання коштовного обладнання і реактивів, що дає можливість рекомендувати його для створення імунізуючих і діагностичних препаратів проти токсигенних *E.coli*, що відповідає критерію "новизна".

Спосіб виконується таким чином.

Штами *E.coli*, які синтезують ST і LT-ентеротоксини, висівають окремо на Синтетичне поживне середовище і інкубують при 37 °C протягом 4-х годин, центрифугують при 6000-8000 об/хв. протягом 30-40 хвилин при 4 °C і отримують безклітинні супернатанти, які ліофілізують без передчасної їх очистки; 100 мг LT-ентеротоксину *E.coli* розчиняють у 2,0 мл 0,1 М фосфатного буфера з pH 6,8, який містить 12,5 г/л глутаральдегіду, через 18-20 годин інкубації при кімнатній температурі суміш наносять на хроматографічну колонку 0,9х60 см з сефадексом G-25, урівноважену 0,15 М розчином хлориду натрію; фракції, які містять активований LT (екстинція при 403 нм) об'єднують і концентрують в 5 разів ПЕГ з молекулярною масою 35000-40000 D, до цього розчину додають 40-60 мг ST, розчиненого в 10 мл 0,15 М хлориду натрію і 1,0 мл карбонат-бікарбонатного буфера; через 20-24 години інкубації при 4°C додають 1,0 мл 0,2 М розчину лізину і на 1-3 години ставлять на діаліз проти фосфатно-сольового буфера; кон'югат центрифугують 10-30 хвилин при 1000-3000 об/хв. і зберігають при 4 °C.

Приклад 1. Визначали оптимальне співвідношення LT:ST, при якому досягалось максимальне зв'язування ST у кон'югат, (фiг.1).

Приклад 2. Імуногенні властивості кон'югату ентеротоксинів *E.coli*, перевіряли на білих безпородних мишах масою 14-16 г. Мишей прищеплювали підшкірно, двічі, в дозі 0,3 мл (перша ін'єкція) і 0,5 мл (друга ін'єкція) з інтервалом між введеннями 7 днів. На 21 добу після другого введення препарату визначали напругу імунітету шляхом інтраперитоніального зараження мишей 2DIm токсинів і 2LD культур гомологічних і гетерологічних штамів. Кон'югат вважали імуногенним, коли виживало більше 50 % тварин (табл.1.).

Приклад 3. Порівнювали спосіб двоступінчатої глутаральдегідної кон'югації з прототипом по таких показниках, як швидкість реакції і вміст ST в кінцевому продукті. Кількість (%) ST у кінцевому кон'югаті визначали по різниці концентрацій білка до і після діалізу (табл.2).

Основними перевагами способу двоступінчатої глутаральдегідної кон'югації ST і LT ентеротоксинів *E.coli* є: прискорення одержання препарату у 2,7 разу, збільшення вмісту ST в кінцевому кон'югаті у 2,5 разу, підвищення специфічності за рахунок використання нативних ентеротоксинів, суттєве скорочення робочого часу, зайнятого відповідними операціями, спрощення і мінімізація числа процедур, позбавлення трудомісткості. Спосіб не потребує коштовного і малодоступного обладнання і реактивів, і може бути рекомендований для створення імунізуючих препаратів проти токсигенних *E.coli*, а також для конструювання діагностичних систем на їх основі.

Таблиця 1

Кількість (%) виживших імунізованих кон'югатом ентеротоксинів білих безпородних мишей, масою 14-16 г, після зараження їх 2DIm ST-ентеротоксину і 2LD культур гомологічних і гетерологічних штамів *E.coli*.

| Імунізуючий препарат | Кількість (%) виживших імунізованих мишей після зараження ($X \pm s$, $n = 5$) | | | |
|-------------------------|---|-----------------|---|-----------------|
| | 2DIm ентеротоксинів | | 2 LD культури | |
| | гомологіч. гетерологіч. штамів <i>E.coli</i> | | гомологіч. гетерологіч. штамів <i>E. coli</i> | |
| Кон'югат ентеротоксинів | 93,6 \pm 0,07 | 84,0 \pm 0,07 | 90,6 \pm 0,06 | 80,0 \pm 0,04 |

Таблиця 2

Тривалість приготування (год.) і вміст ST-ентеротоксину *E.coli* в кінцевому кон'югаті (%).

| Спосіб одержання кон'югату | ST-ентеротоксин в кінцевому кон'югаті (%) | Тривалість приготування кон'югату (год.) |
|--|---|--|
| Двоступінчатий глутаральдегідний | 98,25 \pm 2,36 | ~26 |
| Одноступінчатий глутаральдегідний (прототип) | 39,25 \pm 0,95 | ~70 |

